

# 電気化学的手法を用いた タンパク質化学修飾法

東京工業大学 科学技術創成研究院

教授 中村 浩之

2021年11月2日

# 標的タンパク質のラベル化

## 一般的なラベリング

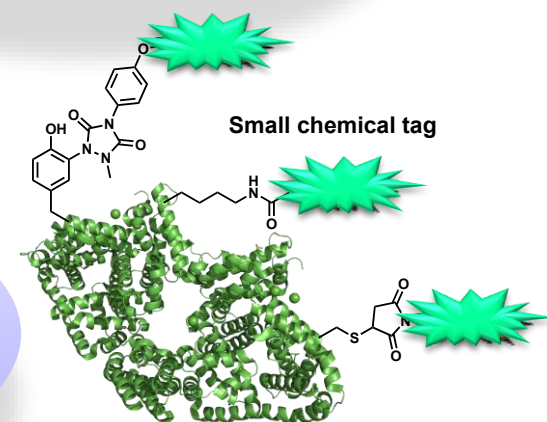
GFP fusion tag

Antibody

遺伝子組換えが必要  
タグ分子が大きい

## ケミカルラベリング

Small-molecule



生細胞内での  
標的タンパク質のラベル化

機能

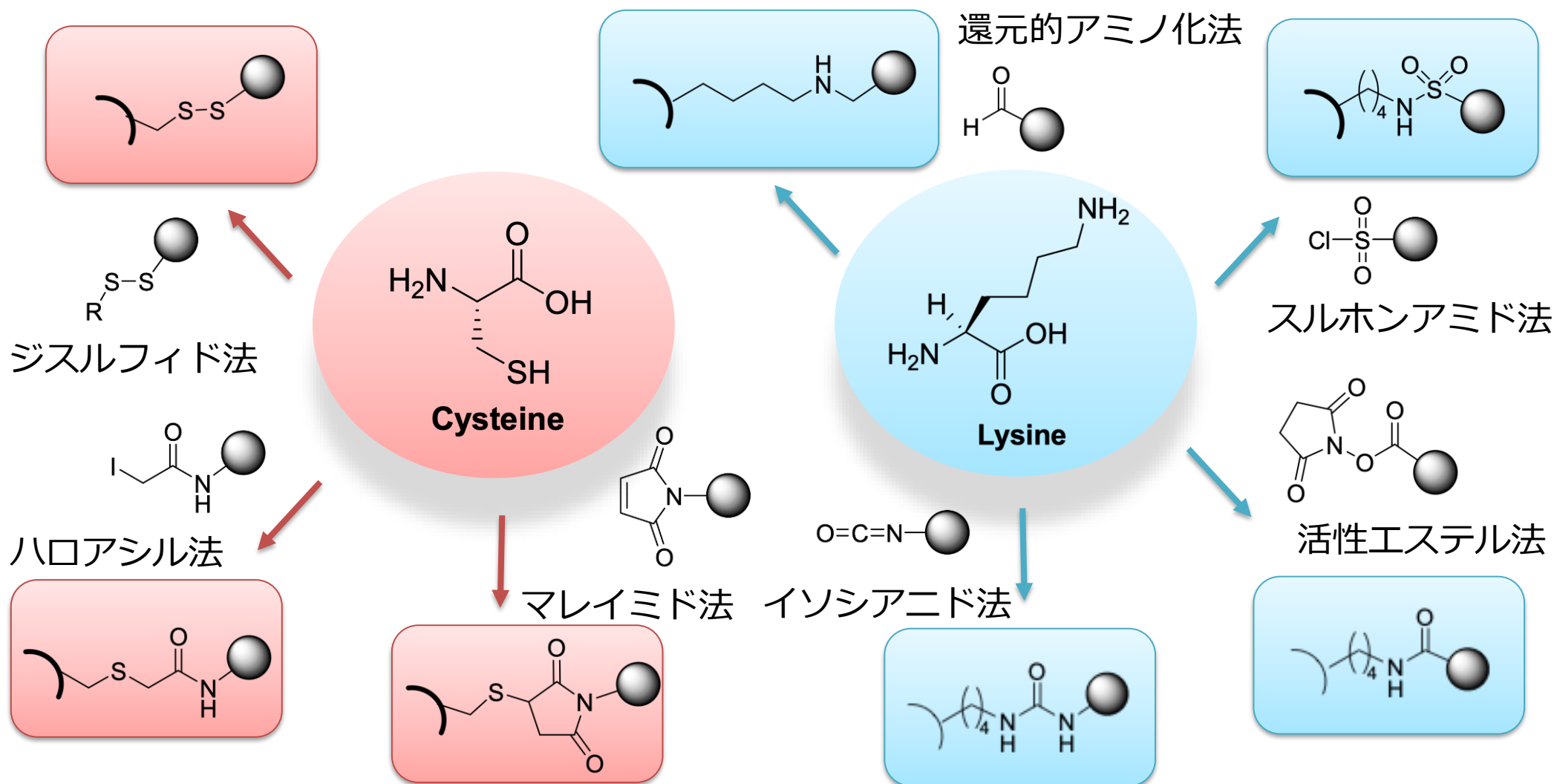
ダイナミクス

局在

クロストーク

# 従来のタンパク質ラベル化法

一般的なタンパク質ラベル化法は、求核的なアミノ酸残基である **cysteine** あるいは **lysine** への求電子剤との反応が多い



# 従来技術: システイン残基ラベル化法と その問題点

既に実用化されているものには、マレイミドを用いた共役付加反応法等がある。

レトロ付加反応に起因する脱離が起こる  
反応溶液のpHの上昇により選択性が低下  
フリーのSH基がタンパク質内に少ない  
等の問題があり、使用するには制限が多い。

# 従来技術: リジン残基ラベル化法と その問題点

既に実用化されているものには、N-ヒドロキシスクシンイミドを用いた活性化エステル法等がある。

プロテアーゼに起因する加水分解が起こるラベル化に伴うタンパク質表面電荷の変化ラベル化数、部位選択性の制御が困難等の問題があり、使用するには制限が多い。

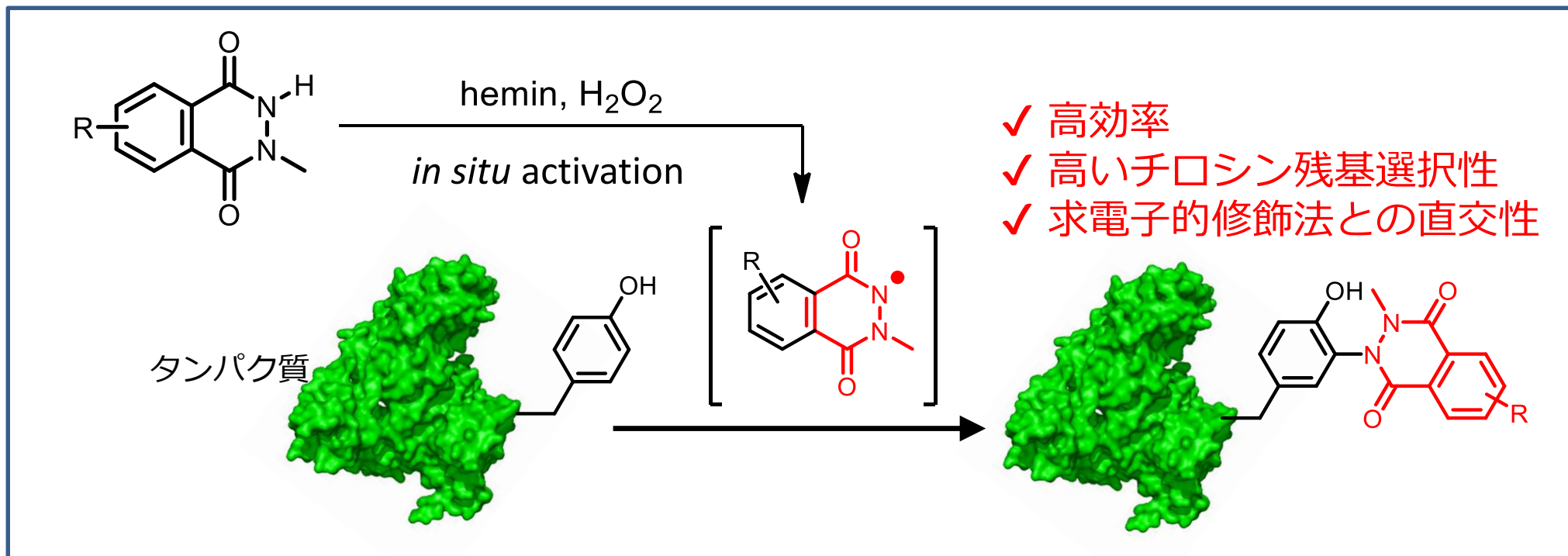
# 新技術：チロシン残基ラベル化法

- ① Heminを用いたチロシン残基ラベル化法
- ② 電気化学的手法による修飾タンパク質の製造方法
- ③ 高反応性試薬によるチロシン残基ラベル化法

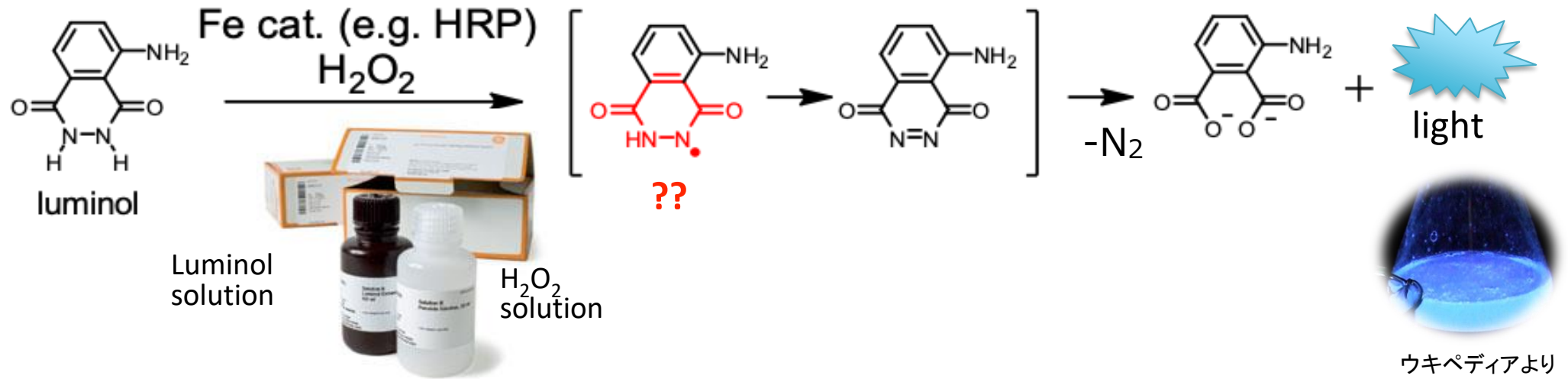
# 新技術①: Heminを用いたチロシン 残基ラベル化法

特許第6598286号 (特許権者: 国立大学法人東京工業大学)

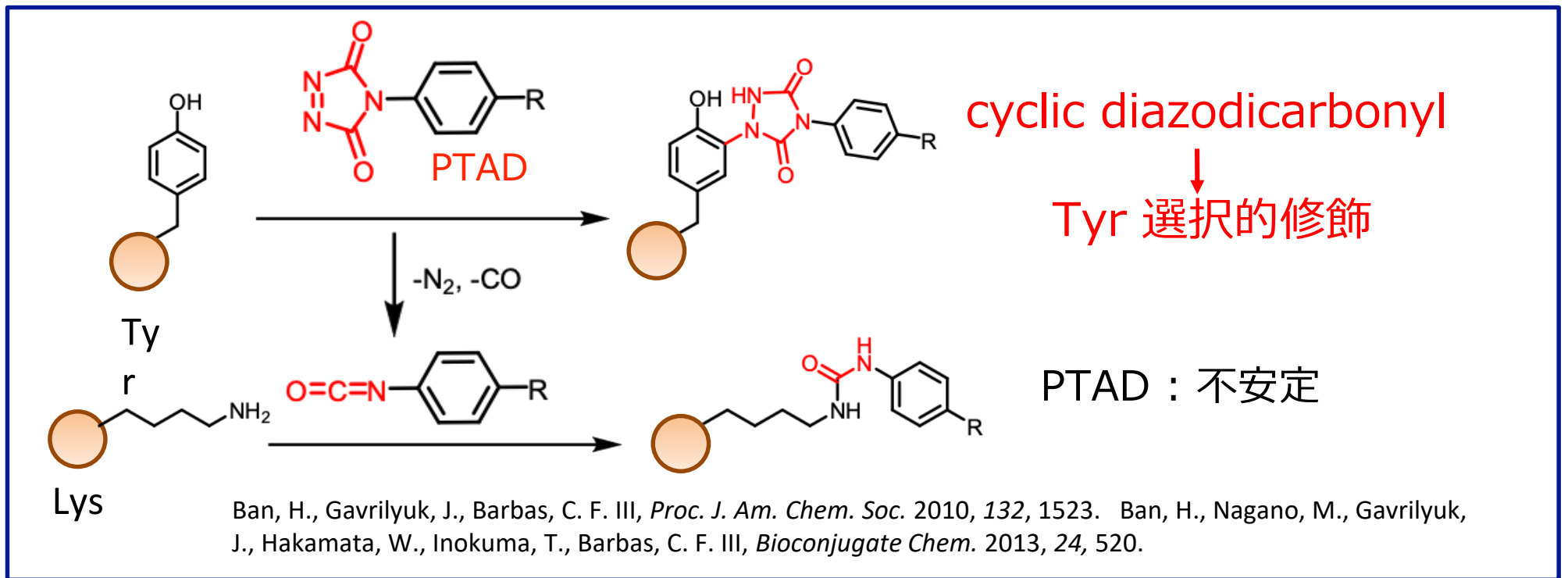
2019年10月11日特許登録



# ルミノール反応のメカニズム

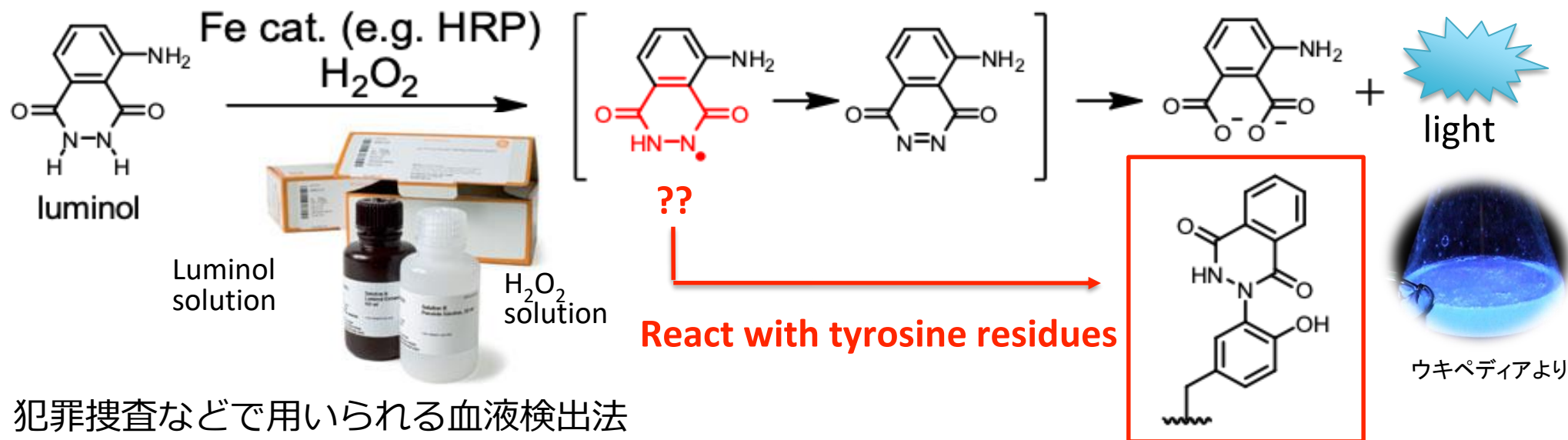


犯罪捜査などで用いられる血液検出法



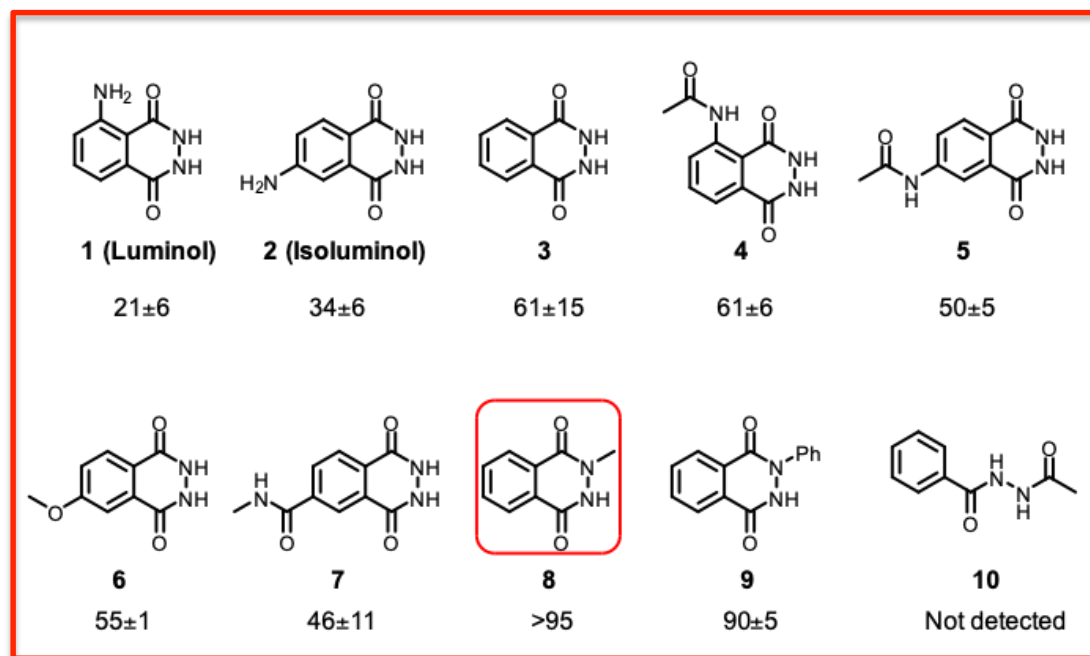
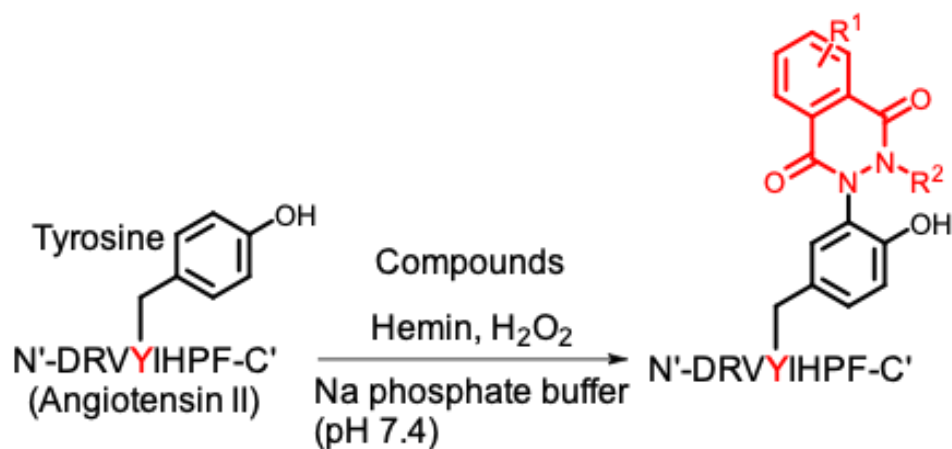


# ルミノール反応のメカニズム



犯罪捜査などで用いられる血液検出法

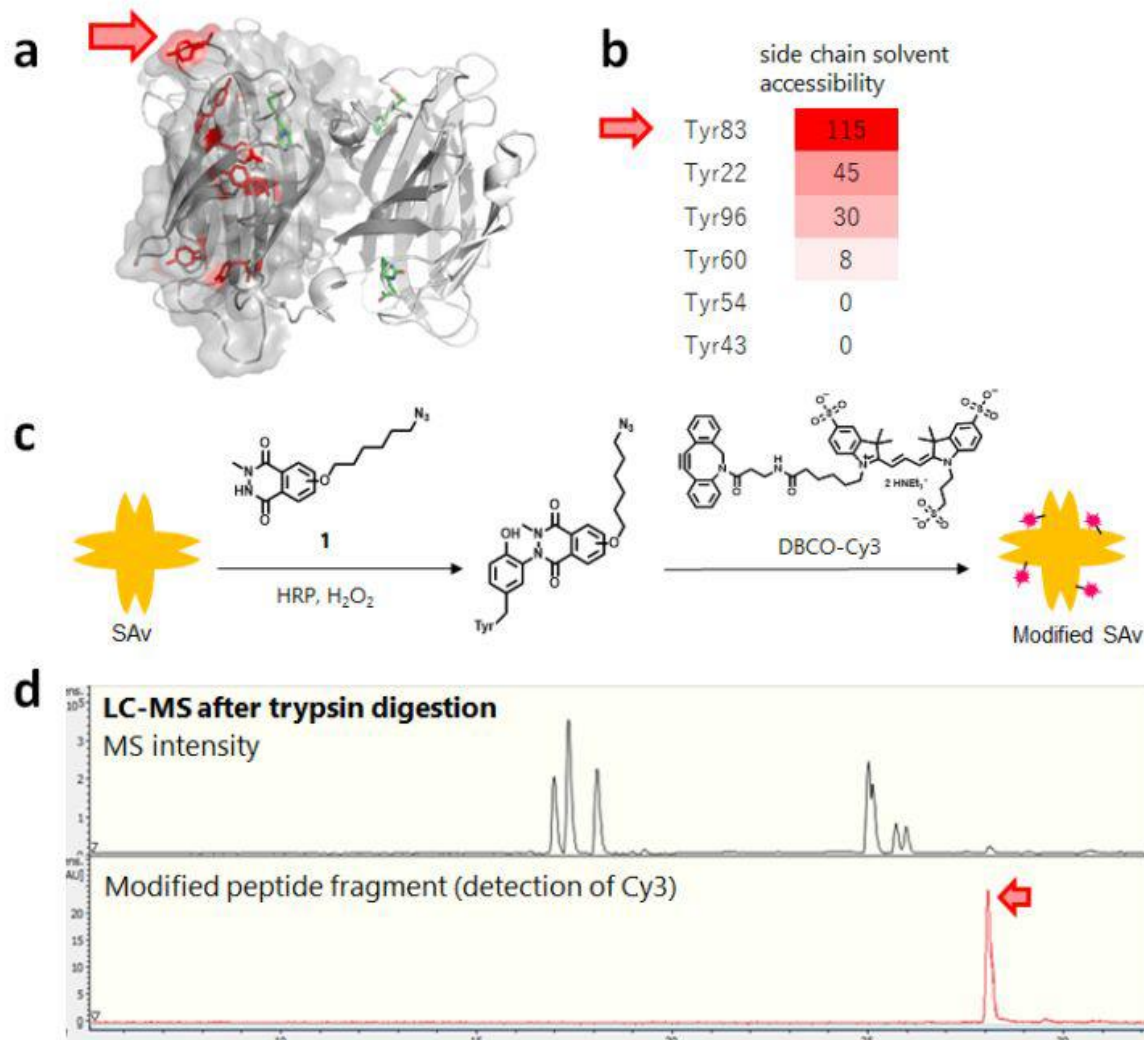
## ルミノール誘導体の構造最適化



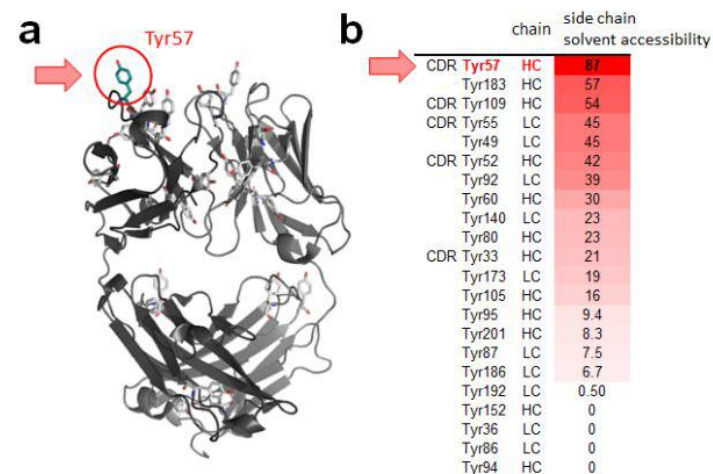
# 新技術の実施例

## ➤ Streptavidin の部位特異的ラベル化

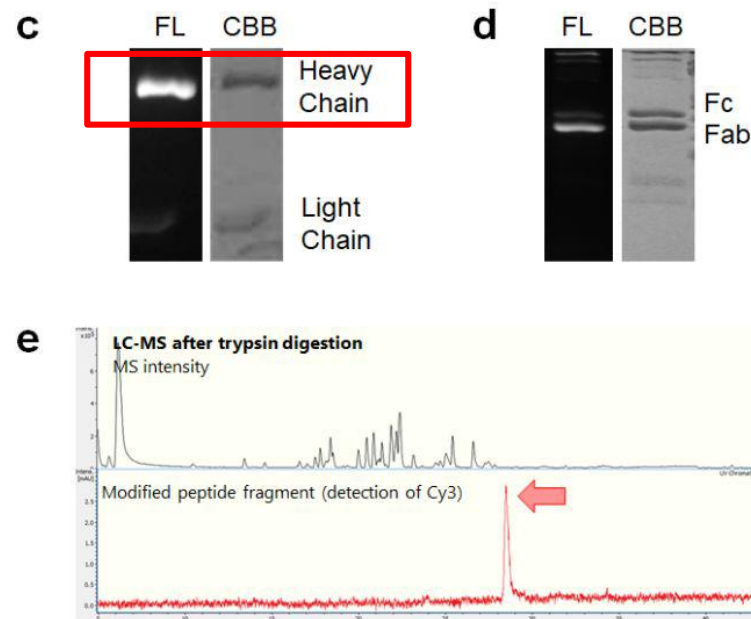
**Tyr83のみラベル化 (溶媒接触度に依存)**



## ➤ Trastuzumab の部位特異的ラベル化

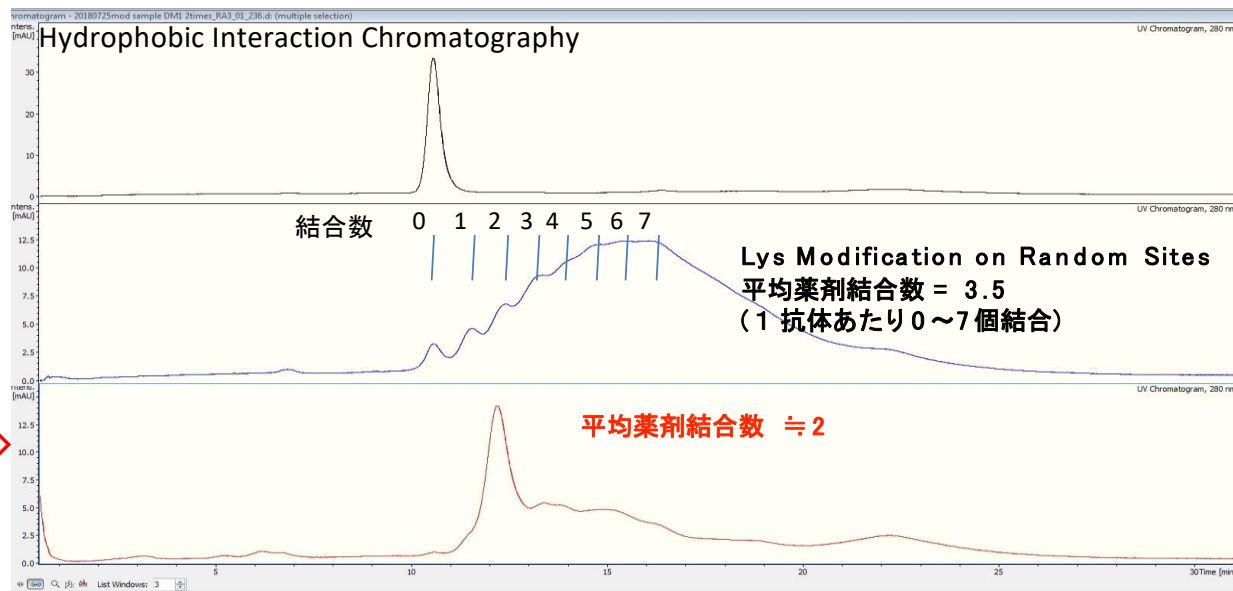
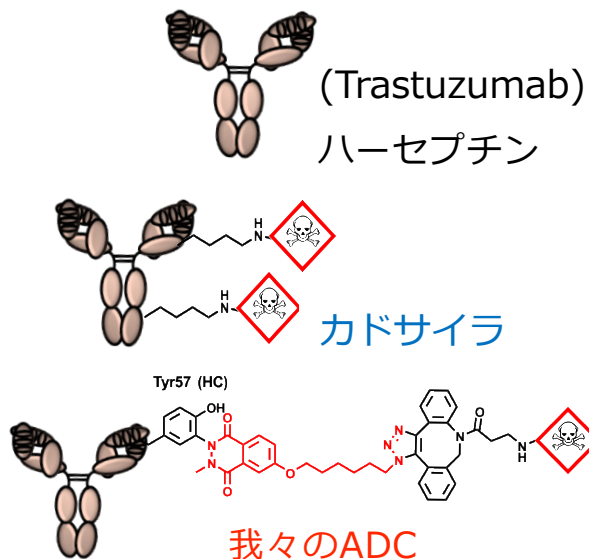


**抗体のCDR領域のTyrに特異的**

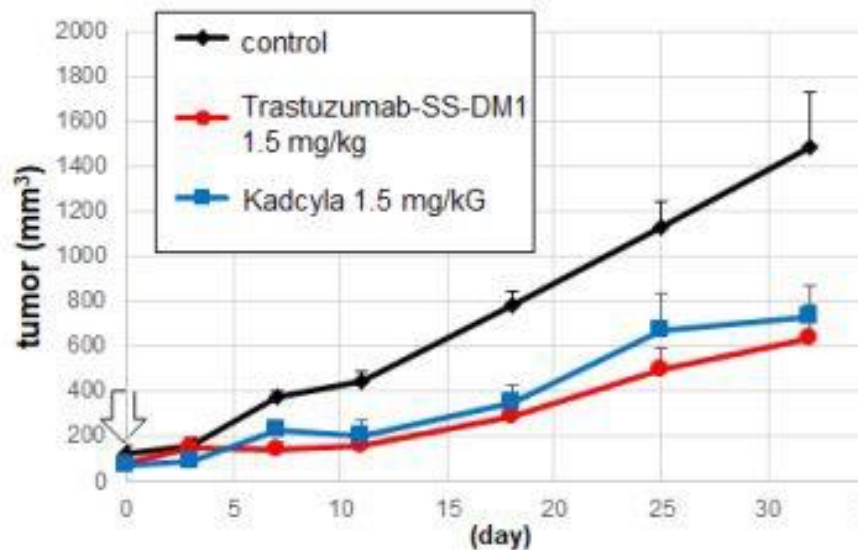
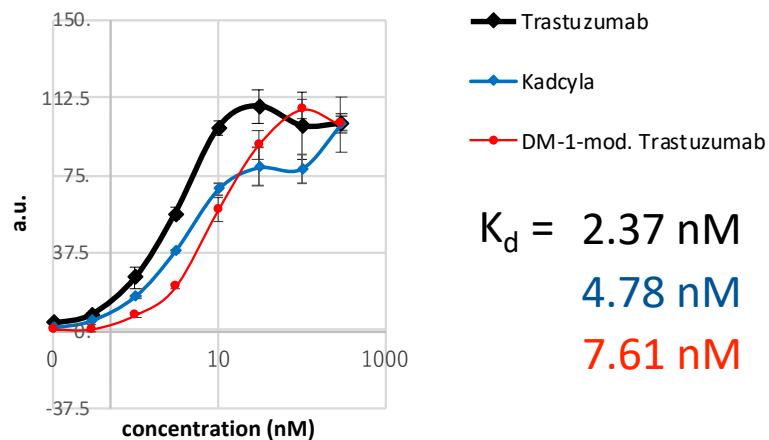


# 新技術の実施例

## ➤ 薬物抗体複合体 (ADC) への応用



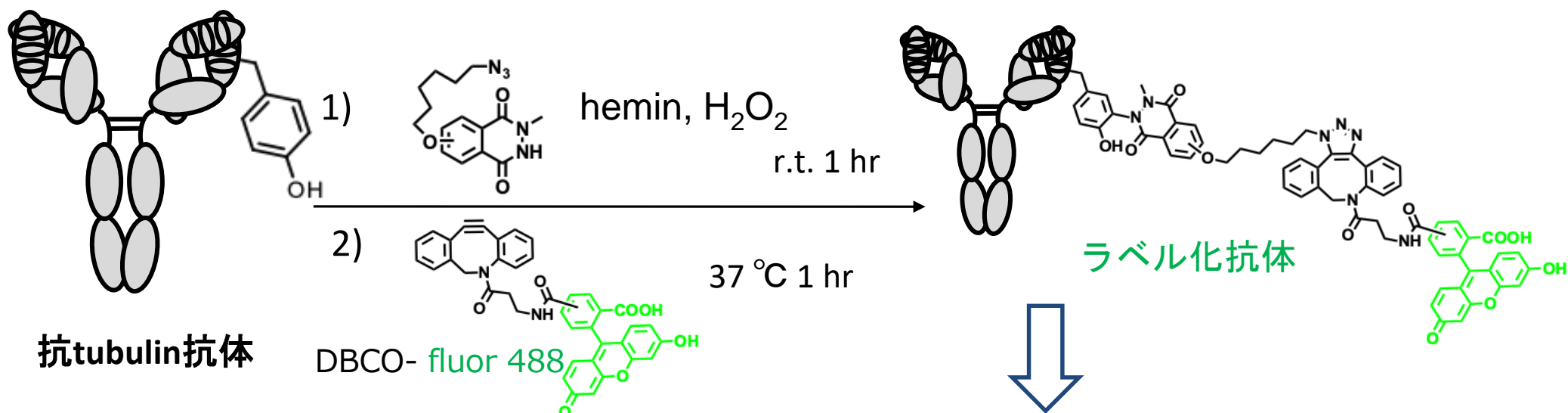
SK-BR-3 (HER2+) cell based ELISA assay



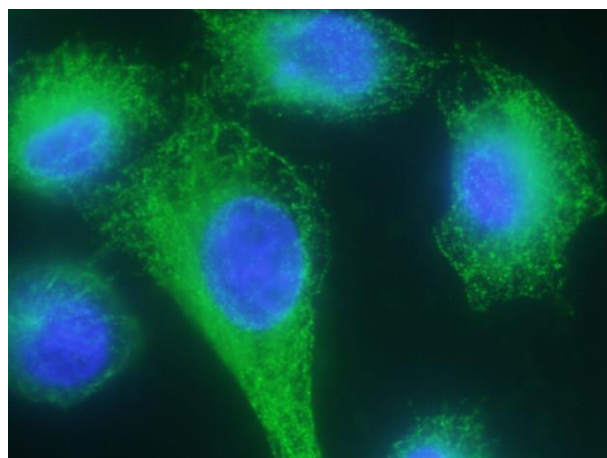
HER2 陽性細胞の腫瘍

# 新技術の実施例

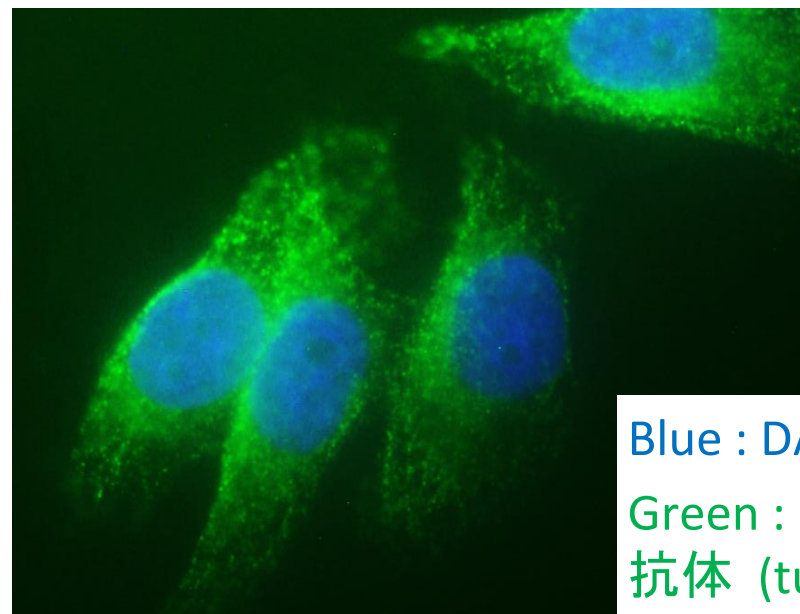
## ➤ 細胞免疫染色法への応用



HeLa cells



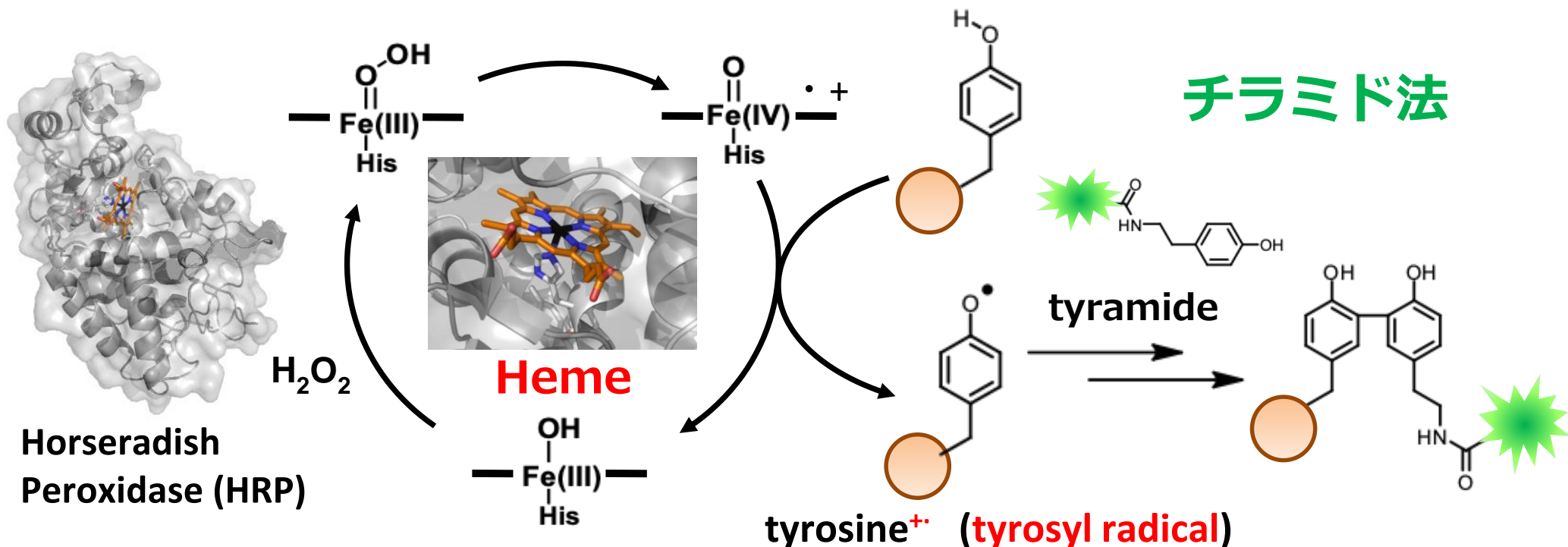
通常の免疫染色  
(抗tubulin抗体+ FITC-二次抗体)



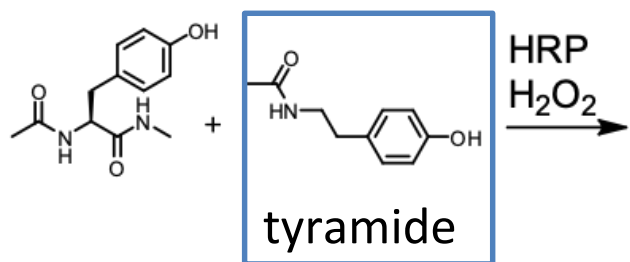
Blue : DAPI  
Green : ラベル化抗体 (tubulin)



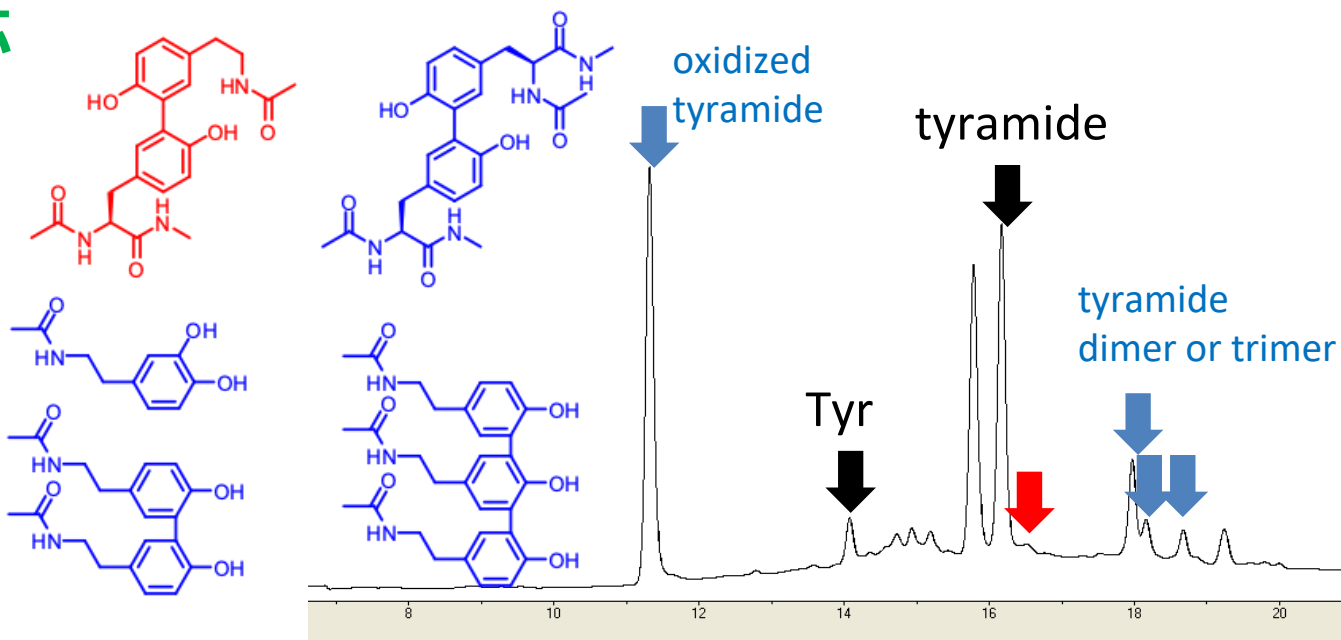
# ➤ 従来法：ペルオキシダーゼによるTyrラベル化機構



- ✓ ラベル化剤同士で反応
- ✓ ラベル化効率 は低い

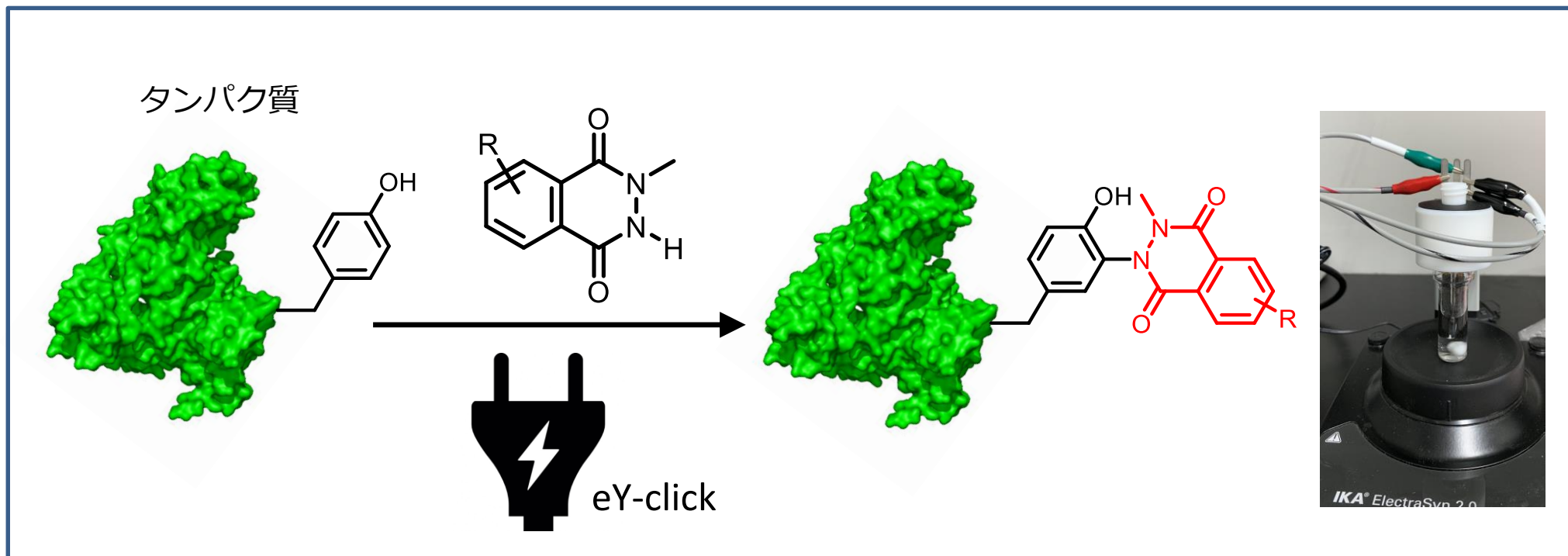


チラミド多量体の生成

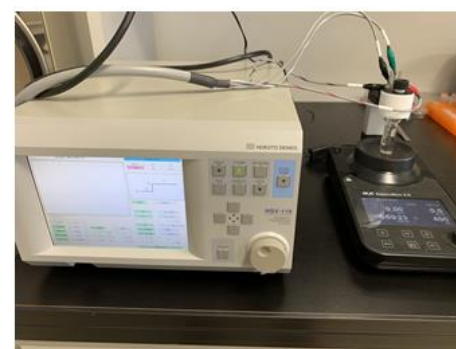
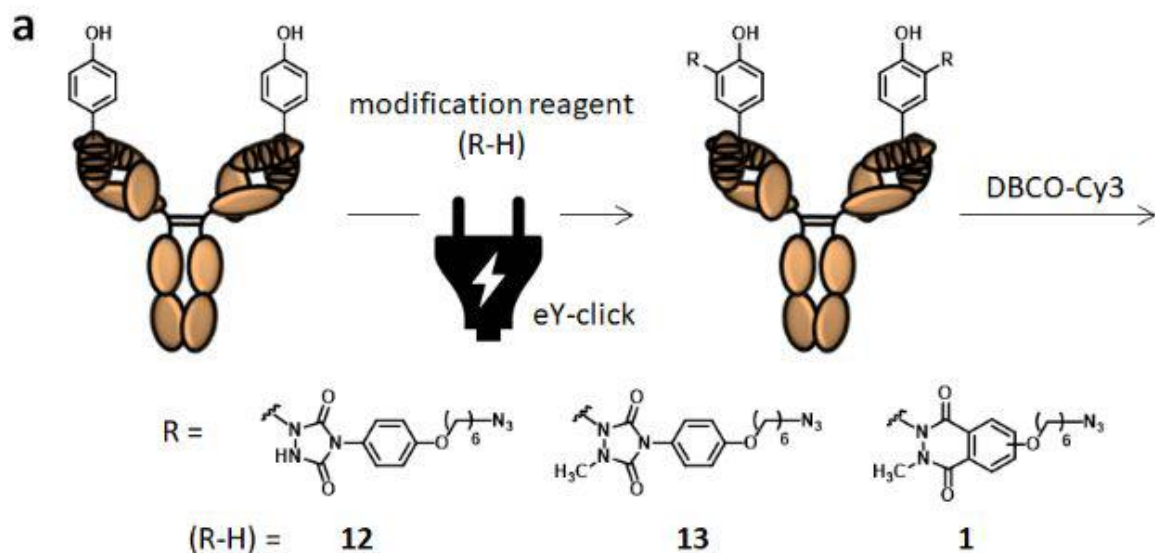


# 新技術②: 電気化学的手法による 修飾タンパク質の製造方法

特願2018-124834 (出願人: 国立大学法人東京工業大学)  
2018年6月29日出願



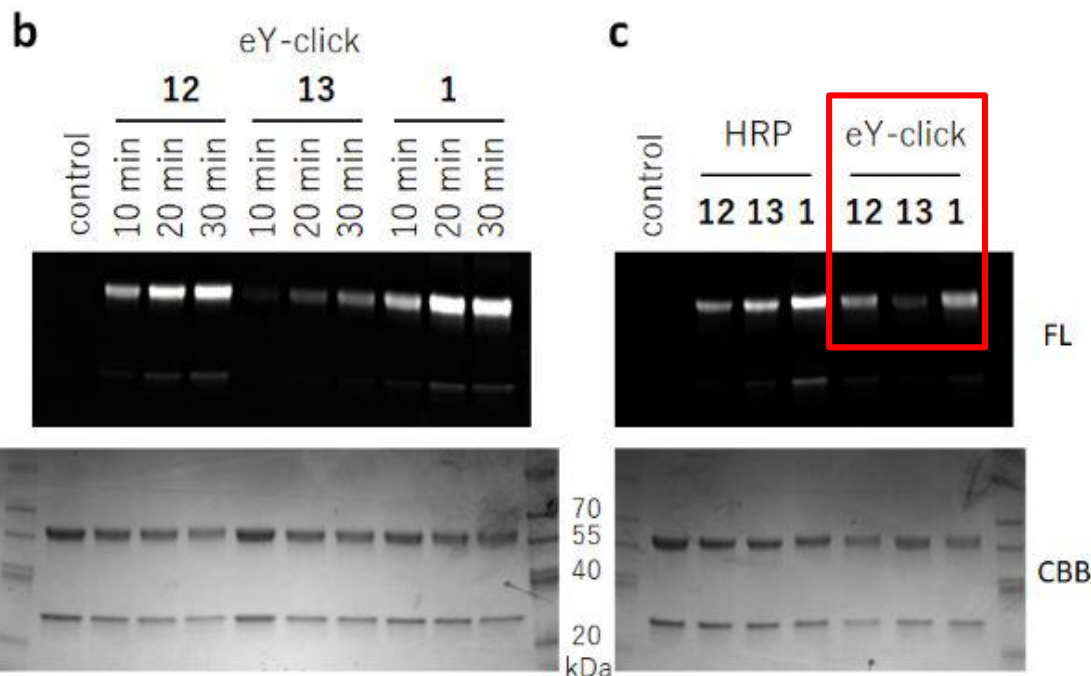
# 新技術の実施例



Scale: 3 mL

## ➤ Trastuzumab のラベル化の比較

- HRPよりややラベル化効率を下がる
- 酸化剤 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) が不要
- 加える試薬が不要 (GMP対応可能)

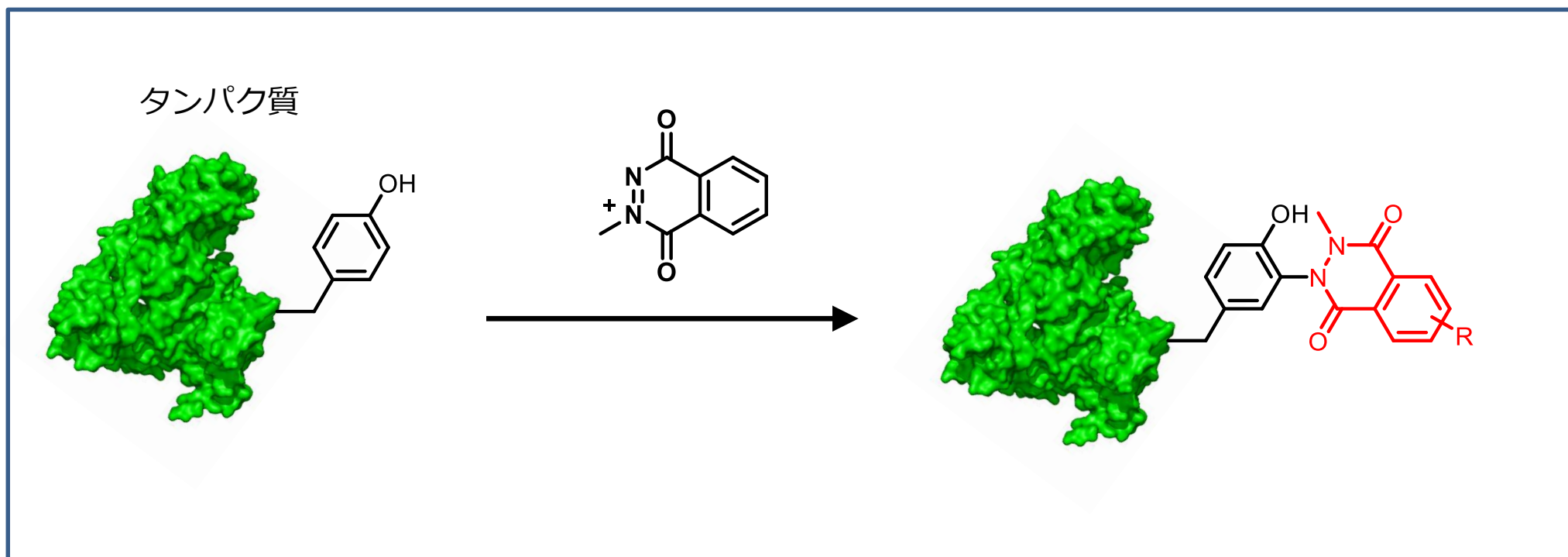


Modified peptide fragment (detection of Cy3)



# 新技術③：高反応性試薬による チロシン残基修飾

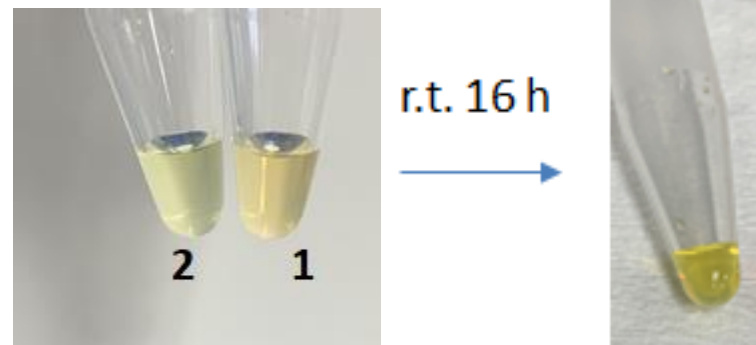
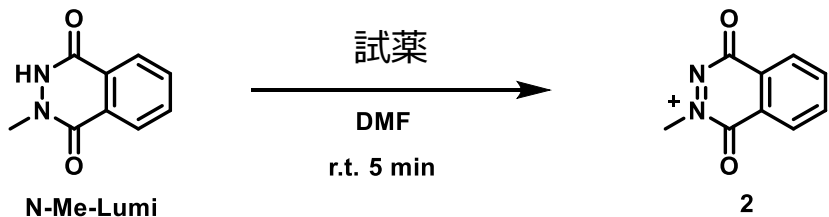
出願人：東京工業大学、特願2020-80345、出願日：2020年4月30日



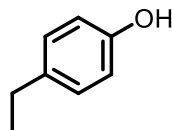


# 新技術の実施例

## ➤ 使用直前にラベル化剤の活性化

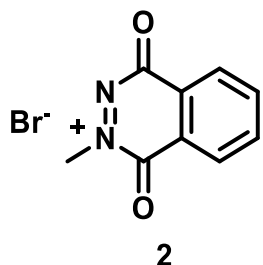


100  $\mu$ M Angiotensin II in 50 mM Tris (pH 7.4), r.t. 20 min



NH<sub>2</sub>-DRVYIHPF-COOH

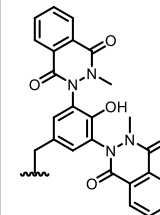
- 安定・保存可能
- 高いラベル化効率



just after preparation

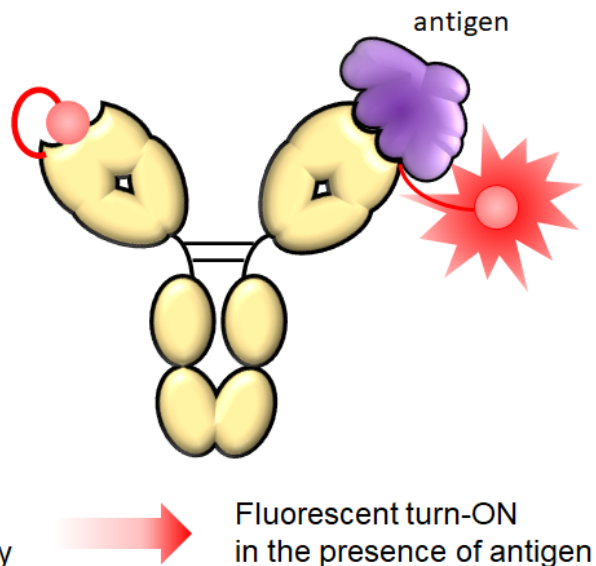
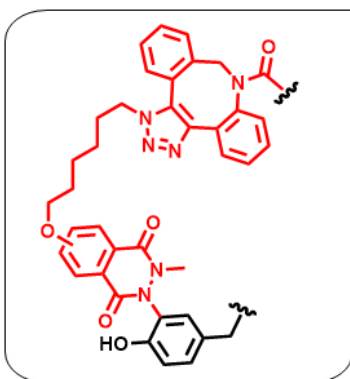
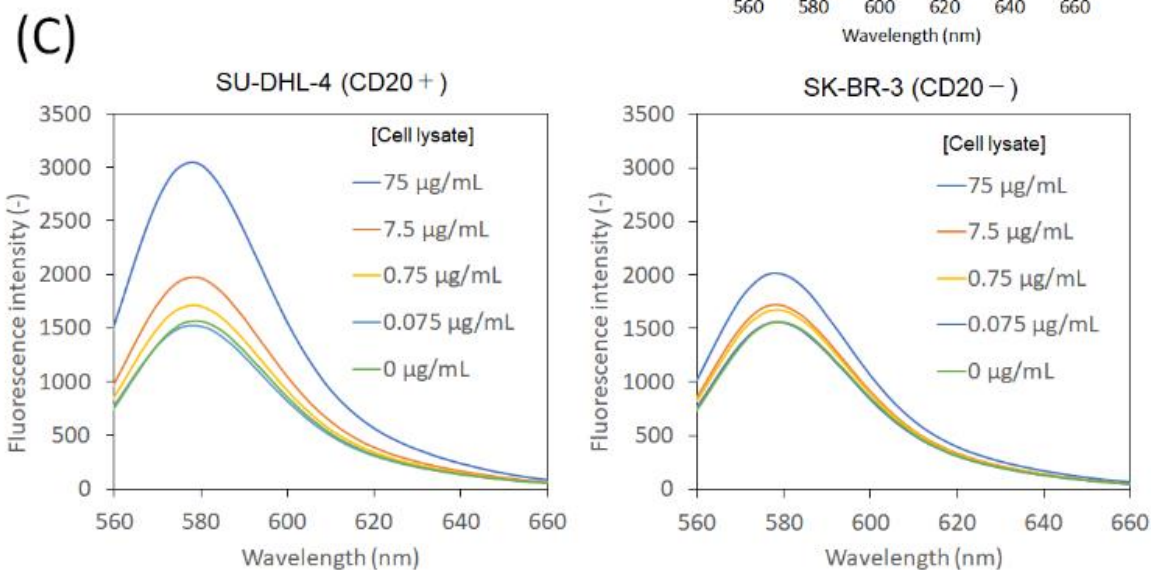
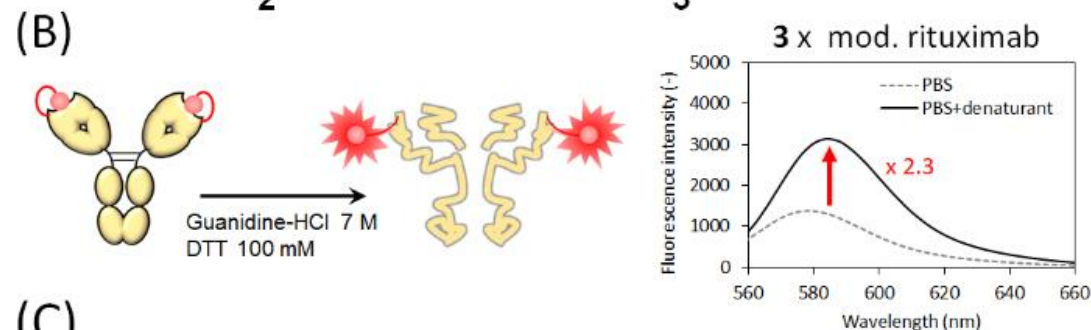
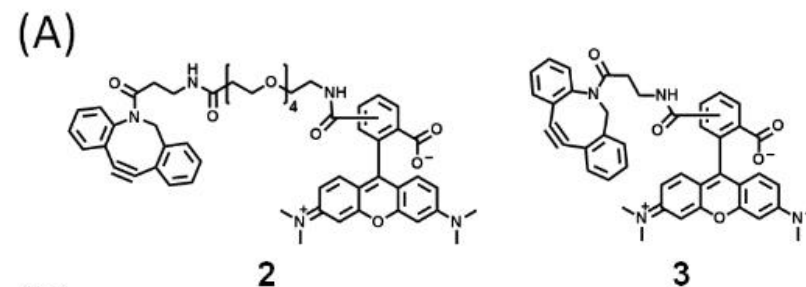
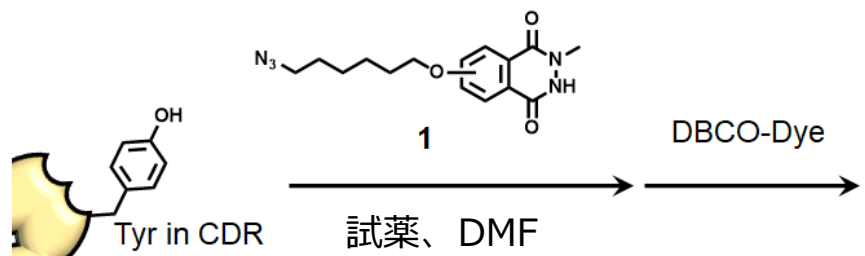
after 3 h r.t.

after 16 h r.t.



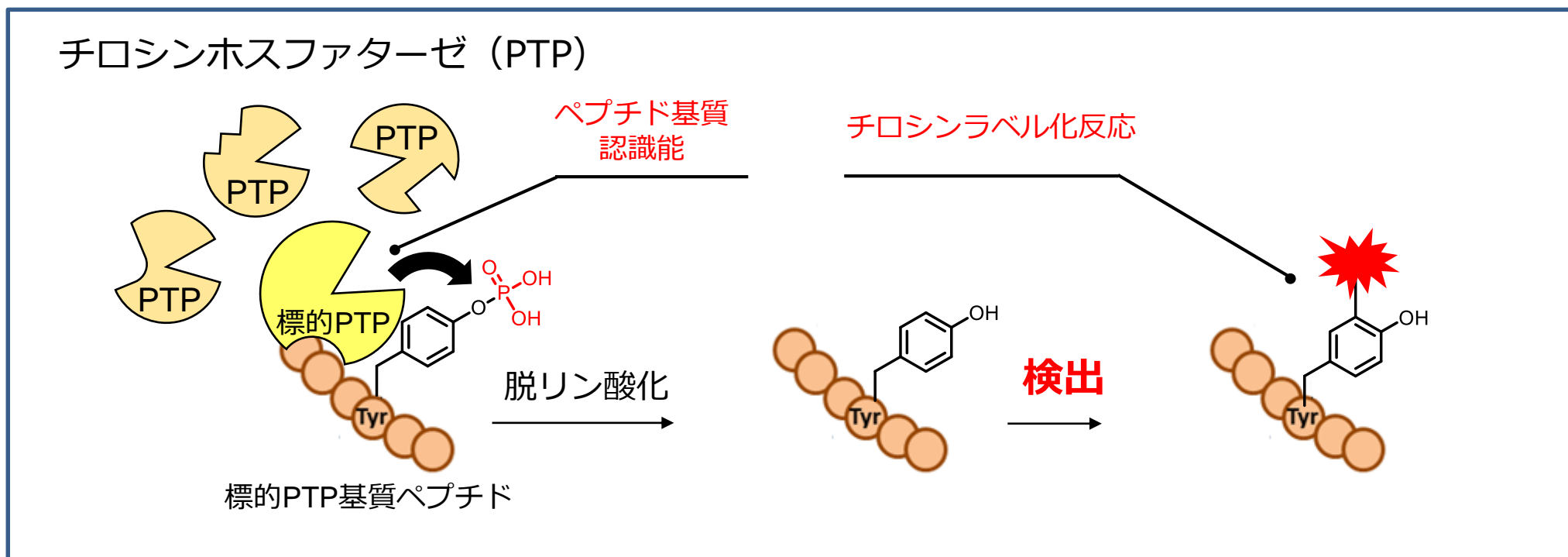
# 新技術の実施例

## ➤ Quench-bodyへの展開



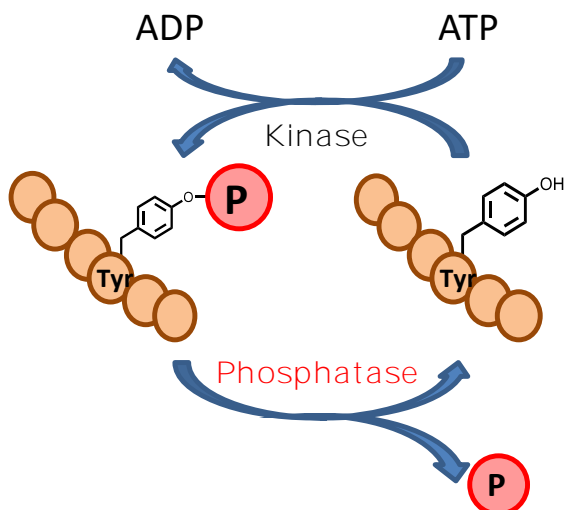
# 新技術④: チロシンホスファターゼ及び チロシンキナーゼ活性の測定方法

出願人：東京工業大学、特許登録番号：第67707550号、登録日：2020年9月30日

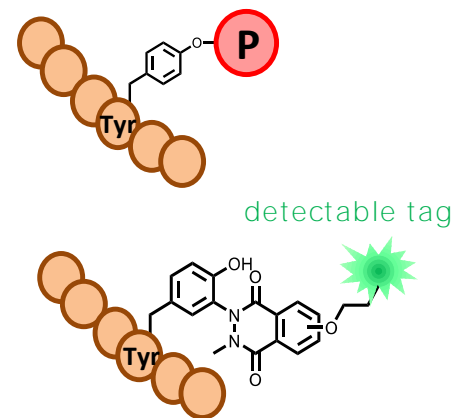


# 新技術の実施例

## チロシンホスファターゼ活性の測定方法

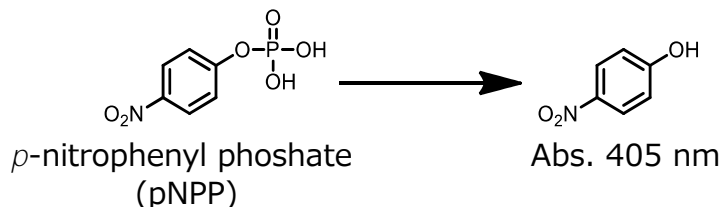


脱リン酸化反応の定量  
チロシンホスファターゼ  
活性検出の新手法



### 従来法

- リン酸化チロシンミミックを基質にする手法



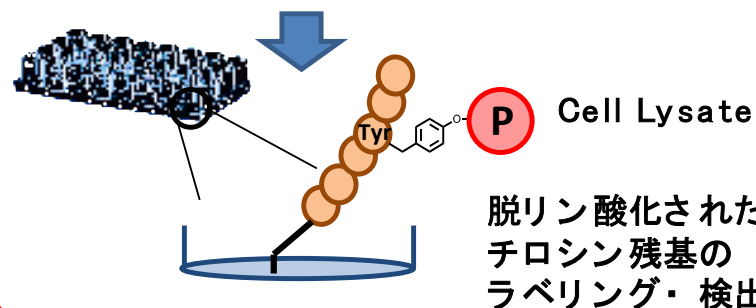
- マラカイトグリーンによる無機リン酸 (P) の定量

×生体の夾雑物とも反応してしまう  
(精製酵素での使用に限定)

### 本技術

- 生体の夾雑物の存在下で基質ペプチドの脱リン化状態を観測できる

e.g. 標的の基質ペプチドをプレートに固定化



# 新技術：チロシン残基ラベル化法の 特徴・従来技術との比較

- 従来のラベル化技術は、生体内での特に酵素に対する安定性に課題があったが、本技術のチロシン残基ラベル化により炭素-炭素結合でラベル化できることから、代謝安定性が担保できる。(技術1～3)
- 従来技術のリジン残基のラベル化では、問題点であった、タンパク質の表面電荷の変化をチロシン残基ラベル化で、回避することに成功。(技術1～3)

# 新技術：チロシン残基ラベル化法の 特徴・従来技術との比較

- 特異的ラベル化が困難であり、生成物は混合物であったが、**溶媒接触度による特異性**が向上したため、**品質が担保**可能となった。  
(技術1～3)
- 従来技術の問題点であった、酸化剤の添加による**タンパク質の酸化を回避**することに成功。  
(技術2)

# 新技術：チロシン残基ラベル化法の 特徴・従来技術との比較

- 従来技術のマラカイトグリーンによるホスファターゼ反応で生成する無機リン酸の検出限界は500 pmolであったが、本技術で非リン酸化ペプチドを **100 pmol のスケールで検出可能**。  
(技術1、3、4)
- 従来技術では、**精製酵素での使用に限定**されていたが、**生体の夾雑物の存在下での標的の基質ペプチドによる検出が可能**。(技術4)

## 想定される用途

- 電気化学的手法によるラベル化では、加える**試薬が不要**であるため、密閉形でのフロープロセスが可能となり、**医薬品(GMP基準)製造**といった用途に展開することも可能。したがって、**核医学**の分野での放射性同位体の導入技術への応用が考えられる。(技術2)



## 想定される用途

- 従来技術の問題点であった、ラベル化剤の不安定性を克服し、ラベル化剤を使用直前に活性化できる本技術は、生化学的実験試薬への用途に展開することも可能。（技術3）
- チロシンホスファターゼ関連の疾患の診断技術、阻害剤スクリーニング法への展開。（技術4）

## 実用化に向けた課題

- 現在、電気化学的ラベル化技術についてマイクロリットルスケールでのプロセスが可能のところまで開発済み。しかし、ラベル化効率の向上の点が未解決である。
- 今後、溶媒接触度の小さいチロシン残基の場合について、ラベル化可能な条件条件設定を行っていくことで、対象タンパク質の範囲を広げていく。。

## 企業への期待

- 核医学の分野での放射性同位体の導入技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、薬物抗体複合体(ADC)を開発中の企業、医療分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。
- さらに、抗体センサーの開発を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

## 本技術①に関する知的財産権

- 発明の名称 : チロシンの修飾方法
- 特許番号 : 第6598286号
- 出願人 : 東京工業大学
- 発明者 : 佐藤伸一、中村浩之

## 本技術②に関する知的財産権

- 発明の名称 : 電気化学的手法による修飾タンパク質の製造方法
- 出願番号 : 特願2018-124834
- 出願人 : 東京工業大学
- 発明者 : 佐藤伸一、中村浩之

## 本技術③に関する知的財産権

- 発明の名称 : 高反応性試薬によるチロシン残基修飾
- 出願番号 : 特願2020-80345
- 出願人 : 東京工業大学
- 発明者 : 佐藤伸一、中村浩之

## 本技術④に関する知的財産権

- 発明の名称 : チロシンホスファターゼ及びチロシンキナーゼ活性の測定方法
- 特許番号 : 第67707550号
- 出願人 : 東京工業大学
- 発明者 : 佐藤伸一、中村浩之、中野洋文

# お問い合わせ先

**東京工業大学**

**研究・産学連携本部**

**TEL 03-5734-2445**

**FAX 03-5734-2482**

**e-mail [sangaku@sangaku.titech.ac.jp](mailto:sangaku@sangaku.titech.ac.jp)**